



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09096637 A**(43) Date of publication of application: **08 . 04 . 97**

(51) Int. Cl.

G01N 33/53
G01N 33/536
G01N 33/92
// C12Q 1/26
C12Q 1/28
C12Q 1/44
C12Q 1/60

(21) Application number: **08208918**(22) Date of filing: **19 . 07 . 96**(30) Priority: **21 . 07 . 95 JP 07207663**(71) Applicant: **WAKO PURE CHEM IND LTD**

(72) Inventor: **MIKI YUTAKA**
HANADA TOSHIRO
TANAKA KIYOKO

(54) MEASURING METHOD FOR COMPONENT IN LIPOPROTEIN**(57) Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To determine the quantity of a component to be measured in a specific lipoprotein on the basis of two absorbances obtained by a method wherein a biosample is made to react with a reagent containing an antibody to lipoproteins other than the specific lipoprotein, a reaction liquid thus obtained is made to react with a reagent containing a reagent for measuring the component to be measured in the lipoprotein and the absorbances are measured in these reactions respectively.

SOLUTION: A component to be measured in a specific lipoprotein is cholesterol, triglyceride or the like, for instance. An antibody to lipoproteins other than the

specific lipoprotein in a first reagent is preferably a polyclonal-antibody and thereby the component to be measured is prevented from participating in a measuring reaction on the occasion of the reaction. For a reagent for measuring the component to be measured in a second reagent, a reagent used in an enzyme method is used. A biosample and the first reagent are mixed and made to react with each other and then a first absorbance is measured. Subsequently, a reaction liquid thus obtained and the second reagent are mixed and made to react with each other and then a second absorbance is measured. A value obtained by subtracting a value based on the first absorbance from the one based on the second absorbance is determined and the value of the component to be measured is determined by using a working curve.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-96637

(43) 公開日 平成9年(1997)4月8日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	W
33/536			33/536	F
33/92			33/92	A
// C 1 2 Q 1/26		7823-4B	C 1 2 Q 1/26	
1/28		7823-4B	1/28	

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-208918

(22) 出願日 平成8年(1996)7月19日

(31) 優先権主張番号 特願平7-207663

(32) 優先日 平7(1995)7月21日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72) 発明者 三木 豊

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 花田 寿郎

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 田中 希代子

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(54) 【発明の名称】 リポタンパク中の成分の測定法

(57) 【要約】

【課題】 生体試料中の特定のリポタンパク中の測定対象成分を、従来汎用されていた沈澱法に於て必要であった特定のリポタンパクを分離する為の前処理操作なしで直接自動分析装置等を用いて測定することを可能とする方法を提供。

【解決手段】 生体試料と特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体を含有する第1液とを混合して反応させた後に吸光度 (OD₁) を測定し、次いで該反応液とリポタンパク中の測定対象成分測定用試薬を含有する第2液とを混合し更に反応させた後に吸光度 (OD₂) を測定し、これらOD₂及びOD₁を利用することによる特定のリポタンパク中の測定対象成分の測定方法。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料と、特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体を含有する試液とを混合して反応させた後に吸光度 (OD_1) を測定し、次いで該反応液とリポタンパク中の測定対象成分測定用試薬を含有する試液とを混合し更に反応させた後に吸光度 (OD_2) を測定し、 OD_2 と OD_1 に基づいて特定のリポタンパク中の測定対象成分量を求めることを特徴とする測定法。

【請求項2】 特定のリポタンパクが高比重リポタンパクである請求項1に記載の測定法。

【請求項3】 測定対象成分がコレステロールである請求項1又は2に記載の測定法。

【請求項4】 (i)特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体と緩衝剤とを含む試液、及び(ii)リポタンパク中の測定対象成分測定用試薬と緩衝剤とを含む試液、を含んでなる特定リポタンパク中の測定対象成分測定用キット。

【請求項5】 (ii)にさらに界面活性剤を含んでなる請求項4に記載のキット。

【請求項6】 特定のリポタンパクが高比重リポタンパクである請求項4又は5に記載のキット。

【請求項7】 測定対象成分がコレステロールである請求項4～6の何れかに記載のキット。

【0001】**【発明の詳細な説明】**

【産業上の利用分野】 本発明は、血清、血漿などの生体試料中の特定のリポタンパク中の測定対象成分を測定する方法に関するものであり、特に、臨床検査で測定が広く普及している高比重リポタンパク (High Density Lipoprotein。以下、HDLと略記する。) 中のコレステロールの自動化定量に有利に応用できる測定方法に関する。

【0002】

【発明の背景】 特定のリポタンパク中の測定対象成分、例えばHDL中のコレステロールを測定する方法としては、超遠心分離法、電気泳動法、沈殿法等が知られているが、臨床検査の分野に於ては、超遠心分離法及び電気泳動法に比較して操作が簡便な沈殿法が日常的に広く実施されている。しかしながら、該沈殿法は、血清と沈殿分離剤を混合して特定のリポタンパク以外のリポタンパクを沈殿、遠心分離させた後に、上清を採取するという、不要のリポタンパク画分を分別する前処理工程と、該上清中に存在する特定のリポタンパク画分中の測定対象成分を測定する工程とからなるものであるため、通常の自動分析装置だけで測定を実施することができないという問題を有している。

【0003】 この問題を解決するために、例えば、特開平6-242110号公報に開示された方法が開発されている。即ち、特定のリポタンパク以外のリポタンパクを凝集剤

又は/及び抗体を使用して凝集させた後に、特定のリポタンパク中の特定成分の定量用試薬を該成分と反応させ、その後、当該反応を停止させると同時に又は後に、凝集させたリポタンパクを溶解させて、均一溶液としてから該溶液の吸光度を測定するという方法がそれである。

【0004】 しかしながら、この方法は、測定に3又は4種の試薬が必要であるため、3又は4種の試薬を用いて測定が可能なく一部自動分析装置にしか適用できず、通常の臨床検査において用いられている2種の試薬までしか使用できない自動分析装置を用いては測定を実施することはできないという問題がある。また、3又は4種の試薬を用いて測定を行なうため、測定値の再現性が低下するという問題もあった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上記した如き状況に鑑み本発明が解決しようとする課題は、生体試料中の特定のリポタンパク中の測定対象成分を、従来汎用されていた沈殿法に於て必要であった特定のリポタンパクを分離する為の前処理操作なしで直接自動分析装置等を用いて測定することを可能とする方法を提供することにある。

【0006】

【発明を解決するための手段】 本発明は、生体試料と、特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体を含有する試液とを混合して反応させた後に吸光度 (OD_1) を測定し、次いで該反応液とリポタンパク中の測定対象成分測定用試薬を含有する試液とを混合し更に反応させた後に吸光度 (OD_2) を測定し、 OD_2 と OD_1 に基づいて特定のリポタンパク中の測定対象成分量を求めることを特徴とする測定法の発明である。

【0007】 また、本発明は、(i)特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体と緩衝剤とを含む試液、及び(ii)リポタンパク中の測定対象成分測定用試薬と緩衝剤とを含む試液、を含んでなる特定リポタンパク中の測定対象成分測定用キットの発明である。

【0008】 即ち、本発明者らは、特定のリポタンパク中の測定対象成分を、不要のリポタンパクを分離分別する為の前処理操作なしで直接自動分析装置で測定し得る方法を見出すべく鋭意研究を重ねた結果、生体試料と特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体を含有する第1液とを混合して反応させた後に吸光度 (OD_1) を測定し、次いで該反応液とリポタンパク中の測定対象成分測定用試薬を含有する第2液とを混合し更に反応させた後に吸光度 (OD_2) を測定し、これら OD_2 及び OD_1 を利用すれば、不要のリポタンパクを分離分別することなく特定のリポタンパク中の測定対象成分の測定が可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】 リポタンパクはその比重により分類され、例えばカイロミクロン (Chylomicrons ; CM)、超低比

重リポタンパク (Very Low Density Lipoprotein; VLDL)、低比重リポタンパク (Low Density Lipoprotein; LDL)、HDL等に分けられる。

【0010】本発明に於ては、これらのリポタンパクの何れかを特定のリポタンパクとして取りあげ、その中に含まれる特定成分を測定するに際し、まず当該測定の対象となる特定のリポタンパク以外の上記リポタンパクに対する抗体を用いてこれを生体試料と反応させ、吸光度 (OD₁) を測定し、次いで、該反応液に特定成分 (測定対象成分) 測定用試薬を反応させた後に吸光度 (OD₂) を測定し、これら OD₂ 及び OD₁ を利用することにより、不要のリポタンパクを分離分別することなしに特定のリポタンパク中の特定成分 (測定対象成分) の測定を行うことを可能ならしめたのである。

【0011】本発明に於て、特定のリポタンパク中の測定対象成分としては、例えばコレステロール、トリグリセライド、リン脂質等が挙げられる。

【0012】本発明に於て用いられる、特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体としては、例えば血清、血漿等の生体試料と反応させ、次いでこれにリポタンパク中の測定対象成分測定用試薬を反応させる際に、特定のリポタンパク以外のリポタンパク中に含まれる測定対象成分が当該測定反応に関与するのを防止する作用を有するものであればポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、特に限定することなく挙げられ、その由来も特に限定されるものでないが、該防止作用の効果の程度を考慮するとポリクローナル抗体の方が好ましく、また、モノクローナル抗体を使用する場合は抗原認識部位が異なるものを2〜3種類以上、好ましくは5種以上組合せて用いることが望ましい。本発明に於て、好ましい抗体の具体例としては、例えば抗アポリリポタンパク A 抗体、抗アポリリポタンパク B 抗体、抗アポリリポタンパク C 抗体、抗アポリリポタンパク E 抗体等の抗アポリリポタンパク抗体類、例えば抗 α リポタンパク抗体、抗 β リポタンパク抗体等の抗リポタンパク抗体類等が挙げられる。

【0013】これらの抗体のうちから、測定対象成分に応じて最適のものを適宜選択使用すればよい。例えば、HDL中の測定対象成分の測定に於て、HDL以外のリポタンパク中の測定対象成分が測定対象成分測定反応に関与するのを防止するために使用される抗体としては、例えば、抗アポリリポタンパク B 抗体、抗アポリリポタンパク C 抗体、抗アポリリポタンパク E 抗体、抗 β リポタンパク抗体等が挙げられる。

【0014】これら抗体は、目的の防止作用が生ずるのであれば単独で用いても適宜混合して用いても良い。またこれら抗体は、酵素的或は化学的に分解、修飾された例えば F(a b')₂、酵素結合抗体、ハプテン結合抗体等であってもよい。尚、本発明に係る抗体は、血清、血漿等の生体試料と反応させ、次いでこれにリポタンパク中

の測定対象成分測定用試薬を反応させる際に、特定のリポタンパク以外のリポタンパク中に含まれる測定対象成分が当該測定反応に関与するのを防止する作用を有するものであるが、中でも、特定のリポタンパク以外のリポタンパクとの反応によって生じる凝集の程度が、目的の測定に支障をきたさないようなものが適宜選択されて用いられる。

【0015】これら特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体の使用濃度としては、特定のリポタンパク以外のリポタンパク中に含まれる測定対象成分が測定対象成分測定用試薬と反応しないようにし得る濃度以上であればよく、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常0.001〜10mgAb/ml、好ましくは0.01〜1mgAb/mlとなるように第1液中に添加される。

【0016】抗体を含有する試液に於ては緩衝剤をさらに含有させることが望ましい。これらの緩衝剤としては、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、グッドの緩衝剤、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤等の p H5.0〜11.0で緩衝能を有して測定対象成分の測定反応を阻害しないものであれば何れでもよいが、例えば、HDL中のコレステロールの測定に於て用いられる緩衝剤としては p H5.7〜9.1で緩衝能を有する例えば N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸、N-(2-アセタミド)イミノ 2 酢酸等のグリシン誘導体、ヒドロキシアシルアミン誘導体 [より具体的には、例えば N,N-ビス (2-ヒドロキシエチル) -2-アミノエタンスルホン酸、ビス (2-ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン、3- [N,N-ビス (2-ヒドロキシエチル) アミノ] -2-ヒドロキシプロパンスルホン酸等の2-ヒドロキシエチルアミン誘導体、例えばトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、例えば3- [N-トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミン] -2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノエタンスルホン酸等のトリス (ヒドロキシメチル) アミン誘導体等] 等が挙げられ、この中でもヒドロキシアシルアミン誘導体が測定精度の面から特に好ましいものとして挙げられる。特にHDL中のコレステロールを測定する場合に用いる緩衝剤としてはヒドロキシアシルアミン誘導体が好ましい。

【0017】また、これら緩衝剤の使用濃度としては、通常10mM〜1M、好ましくは20〜500mMの範囲から適宜選択される。

【0018】また、本発明に於て用いられる測定対象成分測定用試薬としては、リポタンパク中に含まれる測定対象成分を測定するために使用可能なものであれば特に限定されず、この分野で自公知の測定方法に使用されるものは全て使用できる。尚、現在、この分野では酵素を利用した各種測定法 (酵素法) が普及しており入手が容易であるので、本発明に於てもこの酵素法に用いられる試薬の利用が特に有利である。

【0019】例えば、リポタンパク中のコレステロールを測定するための試薬としては、例えばコレステロールオキシダーゼ(COD)、コレステロールエステラーゼ(CHE)、ペルオキシダーゼ(POD)、被酸化性発色剤等を含有する酸化呈色法用試薬、例えばCHE、コレステロール脱水素酵素(CHD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)等を含有する紫外部測定法用試薬等の自体公知の測定方法に於て用いられる試薬が挙げられる。また、リポタンパク中のトリグリセライドを測定するための試薬としては、例えばグリセロキナーゼ-グリセロール-3-ホスフェート オキシダーゼ法、グリセロールデヒドロゲナーゼ法、グリセロキナーゼ-グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ法等の自体公知の測定方法に於て用いられる試薬が挙げられ、リポタンパク中のリン脂質を測定するための方法としては、例えば有機溶媒抽出法、ホスホリパーゼDとコリンオキシダーゼを用いた方法等の自体公知の測定方法に於て用いられる試薬が挙げらる。

【0020】尚、これら各測定用試薬は、通常抗体を含有しない試薬(第2液)中に含有されるが、これらの一部、例えばPOD、被酸化性発色剤、NAD等は抗体を含有する試薬(第1液)中に含有させておいても良い。また、これら測定試薬の各成分の使用濃度としては、通常この分野で測定の際に使用される濃度範囲から適宜選択して用いれば足りる。

【0021】界面活性剤には測定対象成分(特にコレステロール)の測定反応速度を促進し測定に要する時間を短縮することを可能とするという効果があるので、本発明に於て用いられる抗体を含まない試液(第2液)中には界面活性剤が含まれていても良い。このような目的で添加し得る界面活性剤としては、特定のリポタンパク中の測定対象成分の測定反応を阻害するような性質を有さないものであれば、非イオン界面活性剤、両性界面活性剤、陽イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤の何れにてもよく、特に限定されない。このような界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル(例えばポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等)、ポリエチレングリコールモノラウレート等の非イオン性界面活性剤、例えば、ステアリルベタイン、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等の両性界面活性剤、例えば、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、アルキルベンジルジメチル等の陽イオン性界面活性剤、例えば、コール酸、デオキシコール酸、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤が挙げられる。尚、本発明の方法を自動分析装置へ適用する場合には、第2液中に上記の如き界

面活性剤を添加しておくことが望ましい。また、測定精度の面を考慮すると中でもHLB12~17の非イオン性界面活性剤がより好ましい。特にHDL中のコレステロールを測定する場合に用いられる非イオン性界面活性剤としてはHLB12~17のものが好ましい。尚、これら界面活性剤は単独で用いても、或は適宜混合して用いても何れにてもよい。

【0022】また、これら界面活性剤の使用濃度としては、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常0.001~10w/v%、好ましくは0.01~1w/v%となるように通常は第2液中に添加される。

【0023】尚、抗体を含む試液(第1液)中に界面活性剤を添加すると特定のリポタンパク以外のリポタンパク中の測定対象成分に由来する測定誤差が生じる場合があるので注意が必要である。

【0024】また、本発明の測定法に於て用いられる、第1液及び第2液中には、免疫凝集反応を利用した測定法に於て通常用いられる、所謂凝集促進剤(例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール等)は基本的に添加されない。即ち、先にも述べたように本発明の測定法に於て凝集の程度が強くなり過ぎるとOD₁の値が高くなり過ぎて目的のリポタンパク中の特定成分の測定に支障をきたすことになるからである。尚、このことは凝集促進剤の添加を全く排除することを意味するものではなく、目的の測定に支障をきたさない濃度範囲であれば、これら所謂凝集促進剤に属する化合物が第1液及び第2液中に共存していてもよい。

【0025】本発明の測定法を実施するには、例えば以下の如く行えばよい。即ち、例えば血清、血漿等の生体試料と、特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体と緩衝剤とを含有する第1液とを混合し、2~40℃で3~30分間反応させた後に吸光度(OD₁)を測定する。次いで、該反応液と、測定対象成分測定用試薬及び緩衝剤、要すれば界面活性剤を含有する第2液とを混合し2~40℃で3~30分間反応させた後に吸光度(OD₂)を測定する。上記のOD₂から、OD₁に由来する値(例えばOD₁に液量補正計数をかけて求めた値)を差し引いた吸光度(OD₃)を求め、得られたOD₃を、例えば予め特定のリポタンパク中の測定対象成分濃度既知の標準液を試料として上記と同じ試薬を用い同様の操作を行って求めた該測定対象成分濃度とOD₃との関係を示す検量線にあてはめることにより、生体試料中の特定のリポタンパク中の測定対象成分の値が求められる。

【0026】本発明の特定のリポタンパク中の成分測定用キットは、上述の特定のリポタンパク中の成分を測定するために使用されるもので、(i)特定のリポタンパクに対する抗体と、緩衝剤とを含む試液(第1液)と、(ii)リポタンパク中の測定対象成分測定用試薬と、緩衝剤と、そしてさらに望ましくは界面活性剤とを含む試液(第2液)とを含んでなるものであり、夫々の構成要件

の好ましい態様、具体例については上で述べたとおりである。

【0027】尚、上記キットに於て、測定への影響が生じないのであれば通常第2液中に含有される測定対象成分測定用試薬の一部を第1液に含有させておいても良い。例えば、酵素法を用いて特定のリポタンパク中のコレステロールを測定する際のコレステロールの測定試薬として、例えばコレステロール オキシダーゼ (COD)、コレステロール エステラーゼ (CHE)、ペルオキシダーゼ (POD)、並びに4-アミノアンチピリン及び酸化剤により4-アミノアンチピリンとカップリングして発色する試薬 (以下、単に発色性試薬と略記する。) を組み合わせた被酸化性発色剤を用いる場合、第1液に特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体と緩衝剤、第2液にCODとCHEと緩衝剤が入っていることが必須条件であり、そして、更にこれに界面活性剤が入っていることが望ましいが、その他の試薬については第1液中、第2液中のどちらに入っているもよい。尚、試液の安定性を考慮すると、例えば第1液中に特定のリポタンパク以外のリポタンパクに対する抗体、緩衝剤及び4-アミノアンチピリンを、また、第2液中にCOD、CHE、POD、発色性試薬、緩衝剤及び界面活性剤を含有させる組合せが特に好ましいものとして挙げられる。

【0028】以下に、実施例及び参考例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限*

〔試薬〕

試液1 (R-1) : 抗βリポタンパク抗血清 (12mgAb/ml : 和光純薬工業(株) 製)	1 w/v%
4-アミノアンチピリン	1 mM
BES-NaOH緩衝液 (pH7.0)	100mM
試液2 (R-2) : COD	3 単位/ml
CHE	3 単位/ml
POD	1 単位/ml
DAOS	1 mM
TritonX-100	0.05w/v%
BES-NaOH緩衝液 (pH7.0)	100mM

〔測定パラメータ (測定条件) 〕

測定方法 ; 2ポイントエンド法 [24]-[50]

試料量 ; 4 μl

R-1 ; 270 μl

R-2 ; 90 μl

測定波長 ; 700/600nm

測定温度 ; 37℃

〔試薬〕

試液1 (R-1) : 抗βリポタンパク抗血清 (12mgAb/ml : 和光純薬工業(株) 製)	1 w/v%
4-アミノアンチピリン	1 mM
ACES-NaOH緩衝液 (pH7.0)	100mM
試液2 (R-2) : COD	3 単位/ml

* 定されるものではない。尚、実施例及び参考例に於て使用される略称の正式名は下記の通りである。

BES ; N,N-ビス (2-ヒドロキシエチル) -2-アミノエタンスルホン酸、

COD ; コレステロールオキシダーゼ、

CHE ; コレステロールエステラーゼ、

POD ; ペルオキシダーゼ、

DAOS ; N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、

10 TritonX-100 (ローム アンド ハアース社商品名) ; ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (HLB : 13.5) 、

ACES ; N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸、

エマレックスNPL-30 (日本エマルジョン(株)商品名) ;

ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル (HLB : 17) 、

トリトンX-405 (ローム アンド ハアース社商品名) ;

ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (HLB : 17.9)

20 【0029】

〔実施例〕

実施例1

日立7150形自動分析装置 ((株)日立製作所製) を使用して、本発明の測定法により血清中のHDL中のコレステロール量を測定した。

〔試料〕 新鮮ヒト血清10検体を試料とした。

※ 〔結果〕 測定結果を表1に示す。

【0030】 実施例2

40 日立7150形自動分析装置 ((株)日立製作所製) を使用して、本発明の測定法により血清中のHDL中のコレステロール量を測定した。

〔試料〕 実施例1と同じ。

※

CHE	10 3単位／ml
POD	1単位／ml
DAOS	1 mM
TritonX-100	0.05w/v%
ACES-NaOH緩衝液 (pH7.0)	100mM

〔測定パラメータ（測定条件）〕実施例1と同じ。

〔結果〕測定結果を表1に併せて示す。

【0031】参考例1

実施例1で用いた血清検体について、従来法のリンタングステン酸・マグネシウム塩沈殿法に基づくHDL-コレステロールE-テストワコー（和光純薬工業(株)製）によりHDL中のコレステロールの測定を行った。尚、測定操作は、同キットの現品説明書の標準操作法に従って行った。

〔結果〕測定結果を表1に併せて示す。

【0032】

〔表1〕

表1

試料 No.	実施例1 (mg/dl)	実施例2 (mg/dl)	参考例1 (mg/dl)
1	56.3	60.7	55.1
2	38.5	46.2	37.3
3	53.3	59.4	54.7
4	47.5	45.0	45.8
5	48.8	54.6	47.2
6	44.7	47.6	42.1
7	62.4	70.5	63.7
8	74.2	79.5	66.9
9	44.9	53.7	41.0
10	53.1	56.6	52.2
平均値	52.4	57.4	50.6
参考例1と の相関係数	0.969	0.931	—

【0033】表1の結果から、本発明の方法によるHD*

〔試薬〕

試液1 (R-1) : 抗アポリポタンパクB抗血清 (12mgAb/ml : ベーリンガー・マンハイム(株)製)	3w/v%
4-アミノアンチピリン	1 mM
Tris-HCl緩衝液 (pH7.2)	100mM
試液2 (R-2) : COD	3単位／ml
CHE	3単位／ml
POD	1単位／ml
DAOS	1 mM
エマレックスNPL-30	0.05w/v%
Tris-HCl緩衝液 (pH7.2)	100mM

* L中のコレステロールの測定値は参考例1（従来法）で求めたコレステロール値と良好な相関を示すことが判る。本発明の測定法により得られた測定値は、参考例1で得られた測定値に比較して若干高くなっている。しかし、参考例1のリンタングステン酸・マグネシウム塩沈殿法によるHDL中のコレステロールは、標準法である超遠心分離法で求められる値よりも若干低めに出ることが知られている。従って、本発明の測定法（特に実施例1）で得られた測定値は標準法の値により近いと考えられる。

【0034】実施例3

日立7170形自動分析装置（(株)日立製作所製）を使用して、本発明の測定法により血清中のHDL中のコレステロール量を測定した。

20 〔試料〕新鮮ヒト血清10検体を試料とした。

〔測定パラメータ（測定条件）〕

測定方法；2ポイントエンド法〔16〕-〔34〕

試料量；4 μ l

R-1；270 μ l

R-2；90 μ l

測定波長；700/600nm

測定温度；37℃

〔試薬〕

試液1（R-1）：抗アポリポタンパクB抗血清（12mgAb/ml：ペーリンガー・

マンハイム（株）製） 3w/v%

4-アミノアンチピリン 1mM

Tris-HCl緩衝液（pH7.2） 100mM

試液2（R-2）：COD 3単位/m l

CHE 3単位/m l

POD 1単位/m l

DAOS 1mM

トリトンX-405 0.1w/v%

Tris-HCl緩衝液（pH7.2） 100mM

〔測定パラメータ（測定条件）〕実施例3と同じ。

〔結果〕測定結果を表2に併せて示す。

【0036】参考例2

実施例3で用いた血清検体について、従来法のリンタン
グステン酸・マグネシウム塩沈殿法に基づくHDL-コ
レステロールE-テストワコー（和光純薬工業（株）製）
によりHDL中のコレステロールの測定を行った。尚、
測定操作は、同キットの現品説明書の標準操作法に従っ
て行った。

〔結果〕測定結果を表2に併せて示す。

【0037】

〔表2〕

表2

試料 No.	実施例3 (mg/dl)	実施例4 (mg/dl)	参考例2 (mg/dl)
11	48.4	38.6	47.2
12	44.7	37.6	42.1
13	66.5	54.1	66.9
14	56.6	45.5	52.6
15	43.5	40.2	41.8
16	36.1	37.6	34.2
17	56.3	45.1	54.2
18	37.8	34.2	36.9
19	51.3	44.6	47.2
20	33.0	30.4	33.6
平均値	47.4	40.8	45.7
参考例2と の相関係数	0.989	0.939	——

40 【0038】表2の結果から、本発明の方法によるHDL中のコレステロールの測定値は参考例2の従来法で求めたコレステロール値と良好な相関を示すことが判る。

【0039】

〔発明の効果〕以上述べたことから明らかな如く、本発明は、不要のリポタンパクを分別するための前処理操作が不要で自動分析装置に直接適用することが可能な、生体試料中の特定のリポタンパク中の測定対象成分を測定する方法を提供するものであり、本発明を利用することにより、①2種の試液で測定可能であるので汎用の自動

50 分析装置を利用して測定が可能であり、且つ良好な再現

性が得られるので高精度の測定が可能となる、②本発明では凝集させた特定のリボタンパク以外のリボタンパクを特定のリボタンパク中の測定対象成分を測定後に再度溶解させて均一溶液とした後に吸光度の測定を行なうと*

* いう工程がないために 2 ポイントエンド法での測定が可能であり、生体試料中の共存物質に由来する吸光度の影響も受け難い、等の効果を奏するものであるので、斯業に貢献するところ大なる発明である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 Q 1/44

7823-4B

C 1 2 Q 1/44

1/60

7823-4B

1/60